

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 05 June 2001 (05.06.01)	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 00362-PCT
<b>International application No.</b> PCT/EP00/08984	<b>Priority date</b> (day/month/year) 14 September 1999 (14.09.99)
<b>International filing date</b> (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)	
<b>Applicant</b> NEUBAUER, Peter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 11 April 2001 (11.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Zakaria EL KHODARY Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TANNERFELDT, Agneta  
Pharmacia AB  
S-112 87 Stockholm  
SUÈDE

Date of mailing (day/month/year) 16 November 2001 (16.11.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 00362-PCT	
International application No. PCT/EP00/08984	International filing date (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
     
 ☐ the inventor
     
 ☐ the agent
     
 ☐ the common representative

Name and Address MARTIN-LUTHER-UNIVERSITAET HALLE- WITTENBERG Universitaetsplatz 10 06108 Halle Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person
     
 ☐ the name
     
 ☐ the address
     
 ☐ the nationality
     
 ☐ the residence

Name and Address PHARMACIA AB Lindhagensgatan 133 SE-112 87 Stockholm Sweden	State of Nationality SE	State of Residence SE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

**The agent's address has also been changed accordingly, as indicated in the above addressee box.**

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Ingrid AULICH  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 19 DEC 2001

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 00362-PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08984	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12P21/02		
Anmelder PHARMACIA AB		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  11/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  17.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Döpfer, K-P  Tel. Nr. +49 89 2399 8547 

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-8                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-9                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/3-2/3                  ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	3-9
	Nein: Ansprüche	1,2
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	3-9
	Nein: Ansprüche	1,2
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt I**

**Grundlage des Bescheides**

1. Die Numerierung der Zeichnungen (1/3, 2/3) weist auf die Existenz eines Blattes 3/3, welches sich aber nicht unter den eingereichten Unterlagen befindet.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
  - D1: EP-A-0 397 097 (LIGHT OIL UTILIZATION RES ASS) 14. November 1990 (1990-11-14) in der Anmeldung erwähnt
  - D2: NEUBAUER P ET AL: 'Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of Escherichia coli' JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 43, Nr. 3, 15. Dezember 1995 (1995-12-15), Seiten 195-204, XP004036875 ISSN: 0168-1656
  - D3: YAZDANI SYED SHAMS ET AL: 'Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy.' BIOTECHNOLOGY LETTERS, Bd. 20, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 923-927, XP000982533 ISSN: 0141-5492
  - D4: TORKVIST M ET AL: 'Protein release and foaming in Escherichia coli cultures grown in minimal medium.' BIOPROCESS ENGINEERING, Bd. 15, Nr. 5, 1996, Seiten 231-237, XP000982521 ISSN: 0178-515X
  - D5: KERNS G ET AL: 'OSCILLATING-FED-BATCH-TECHNIQUE IN OBTAINING CELLULASE' ACTA BIOTECHNOLOGICA, Bd. 8, Nr. 3, 1988, Seiten 285-289, XP000982457 ISSN: 0138-4988 in der Anmeldung erwähnt
  - D6: YING LIN H ET AL: 'Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant Escherichia coli' BRAUWELT, NUERNBERG, DE, Bd. 79, Nr. 1, 14. April 2000 (2000-04-14), Seiten 27-37, XP004222563 ISSN: 0168-1656
  - D7: IMPOOLSUP A ET AL: 'STABILIZATION OF A RECOMBINANT YEAST PLASMID IN NON-SELECTIVE MEDIUM BY CYCLIC GROWTH RATE

CHANGES' BIOTECHNOLOGY LETTERS, Bd. 11, Nr. 9, 1989, Seiten 605-608, XP000982590 ISSN: 0141-5492

2. Neuheit und Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(2)(3) PCT)

- 2.1 Die vorliegende Anmeldung bezieht sich auf ein Verfahren zur Steigerung der Ausbeute von rekombinanten Proteinen in mikrobiellen Fermentationsprozessen. Der gewünschte Effekt wird durch oszillierende Änderung der Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle in der Kultur erreicht. Die folgenden Ausführungen zu Neuheit und erfinderischer Tätigkeit sind im Lichte der Bemerkungen unter Punkt VIII dieses Bescheides zu interpretieren.
- 2.2 Ansprüche 1 und 2 sind so breit formuliert, daß die technischen Lehren der Dokumente des Standes der Technik D3 und D5 (siehe die im Recherchenbericht angegebenen Passagen) der Neuheit der vorliegenden Ansprüche entgegenstehen. Alle Dokumente beschreiben Fermentationsprozesse bei denen durch Oszillation der C-/Energiequelle die Ausbeute an gewünschtem (rekombinanten) Produkt erhöht wird. Der Gegenstand der vorliegenden Ansprüche 3-9 wird im Lichte des zitierten Standes der Technik als neu angesehen.

Wird D4 als nächstliegender Stand der Technik angesehen, ist das vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende technische Problem darin zu sehen, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das eine weitere Ausbeutesteigerung an rekombinanten Proteinen durch geeignete Maßnahmen gestattet. Die Lösung der vorliegenden Anmeldung besteht in der Verkürzung der Oszillationzyklen.

Die Verkürzung des Oszillationszyklus in Zusammenhang mit einer speziellen Fütterungsstrategie führt zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute an rekombinantem Protein. Obwohl aus D3 in Kombination mit D2 ein Hinweis entnommen werden, daß diese Strategie zum Erfolg führen könnte, ist die vorliegende Kombination aus bedeutender Verkürzung der Oszillationszyklen in Verbindung mit einer speziellen Fütterungsstrategie als nicht naheliegend anzusehen und deshalb dem Gegenstand der vorliegenden Ansprüche 3-9 das

Vorliegen erfinderischer Tätigkeit zuzuerkennen.

Da die Priorität als gültig erkannt wird, gehört D6 nicht zum Stand der Technik wie in Regel 64 PCT ausgeführt und findet daher keine Berücksichtigung beider Bewertung von Neuheit, erfinderischer Tätigkeit und gewerblicher Anwendbarkeit.

Der Inhalt von D7 ist im Lichte der vorliegenden Anmeldung *prima facie* nicht relevant.

### 2.3 Gewerbliche Anwendbarkeit (Artikel 33(4) PCT)

Alle vorliegenden Ansprüche genügen den Kriterien des Artikels 33(4) PCT hinsichtlich ihrer gewerblichen Anwendbarkeit.

## Zu Punkt VII

### **Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D4 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

## Zu Punkt VIII

### **Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

1. Der in dem Anspruch 1 benutzte Ausdruck "...kurzen Zyklen..." ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT). Die Länge oder "Kürze" eines Oszillationszyklus ist mit Sicherheit in seiner Relation zur Gesamtdauer der Fermentationszeit zu sehen, d.h. bei einer Fermentationzeit von Tagen oder Wochen könnte selbst ein Stundentakt der Oszillation als kurz angesehen werden.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 00362-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08984	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 13 September 2000 (13.09.00)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 14 September 1999 (14.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 21/02		
Applicant PHARMACIA AB		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 April 2001 (11.04.01)	Date of completion of this report 17 December 2001 (17.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-8, as originally filed.

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. 1-9, as originally filed,

Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19.

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand.

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☒ the drawings, sheets/fig 1/3-2/3, as originally filed,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments*.

1. The numbering of the drawings (1/3, 2/3) indicates the existence of a sheet 3/3, but that sheet cannot be found among the documents submitted.

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-9	YES
	Claims	1, 2	NO
Inventive step (IS)	Claims	3-9	YES
	Claims	1, 2	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

1. This report makes reference to the following documents:

D1: EP-A-0 397 097 (LIGHT OIL UTILIZATION RES ASS), 14 November 1990 (1990-11-14), mentioned in the application

D2: NEUBAUER P. ET AL.: "Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of *Escherichia coli*", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Vol. 43, No. 3, 15 December 1995 (1995-12-15), pages 195-204, XP004036875, ISSN: 0168-1656

D3: YAZDANI SYED SHAMS ET AL.: "Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy", BIOTECHNOLOGY LETTERS, Vol. 20, No. 10, October 1998 (1998-10), pages 923-927, XP000982533, ISSN: 0141-5492

D4: TORNEVIST M. ET AL.: "Protein release and foaming in *Escherichia coli* cultures grown in minimal medium", BIOPROCESS ENGINEERING, Vol. 15, No. 5, 1996, pages 231-237, XP000982521, ISSN: 0178-515X

D5: KERNS G. ET AL.: "OSCILLATING-FED-BATCH-

TECHNIQUE IN OBTAINING CELLULASE", ACTA BIOTECHNOLOGICA, Vol. 8, No. 3, 1988, pages 285-289, XP000982457, ISSN: 0138-4988, mentioned in the application

D6: YING LIN H. ET AL.: "Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant Escherichia coli", BRAUWELT, NUERNBERG, DE, Vol. 79, No. 1, 14 April 2000 (2000-04-14), pages 27-37, XP004222563, ISSN: 0168-1656

D7: IMPOOLSUP A. ET AL.: "STABILIZATION OF A RECOMBINANT YEAST PLASMID IN NON-SELECTIVE MEDIUM BY CYCLIC GROWTH RATE CHANGES", BIOTECHNOLOGY LETTERS, Vol. 11, No. 9, 1989, pages 605-608, XP000982590, ISSN: 0141-5492.

2. Novelty and inventive step (PCT Article 33(2)-(3))

2.1 The present application concerns a method for increasing the yield of recombinant proteins in microbial fermentation processes. The desired effect is achieved by oscillating the concentration of carbon or energy source in the culture. The following explanations with regard to novelty and inventive step should be interpreted in the light of the observations in Box VIII of this report.

2.2 Claims 1 and 2 are drafted so broadly that the technical teachings of the prior art documents D3 and D5 (see the passages indicated in the search report) deprive the present claims of novelty. All documents describe fermentation processes during which the yield of desired (recombinant) product is increased by oscillating the carbon or energy source. The subject matter of the present Claims 3-9

is considered novel over the cited prior art.

If D4 is considered to be the closest prior art, the present application can be considered to address the technical problem of devising a method that enables the yield of recombinant proteins to be further increased by suitable measures. The solution proposed by the present application consists in shortening the oscillation cycles.

A shorter oscillation cycle associated with a special feeding strategy leads to a distinct increase in the yield of recombinant protein. Although D3 in combination with D2 gives an indication that this strategy could be successful, the present combination of a significantly shorter oscillation cycle with a special feeding strategy would not be considered obvious. For this reason, the subject matter of the present Claims 3-9 should be acknowledged to involve an inventive step.

Since the priority is recognised to be valid, D6 is not prior art, as defined in PCT Rule 64, and is therefore not taken into account for the assessment of novelty, inventive step and industrial applicability.

The disclosure of D7 is *prima facie* not relevant in light of the present application.

### 2.3 Industrial applicability (PCT Article 33(4))

All the present claims satisfy the requirements of PCT Article 33(4) for industrial applicability.

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite documents D1-D4 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The expression used in Claim 1, "short cycles..." is vague and unclear and leaves the reader uncertain about the meaning of the technical feature in question. As a result, the definition of the subject matter of this claim is not clear (PCT Article 6). The length or "shortness" of an oscillation cycle should certainly be considered in relationship with the total duration of the fermentation time, that is if the fermentation time lasts for days or weeks, even an hourly oscillation cycle could be considered to be short.



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>00362-PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> <small>siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5</small>	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/08984</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>13/09/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>14/09/1999</b>
Anmelder  <b>MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

#### 1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

#### 4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

#### 5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

- ☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen in Fed-batch-Fermentationen kommt es bei den bisher bekannten Verfahren nach der Induktion der rekombinanten Produktsynthese häufig zu einem Überwachsen der Kultur durch plasmidfreie Zellen und zu einer Verminderung der spezifischen Produktausbeute. Die Ausbeute an rekombinanten Proteinen wird dadurch gesteigert, dass die Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle in der Kultur ständig kurzzeitig abgesenkt beziehungsweise erhöht wird. Die Oszillationen werden durch die Veränderung der Zugaberate der die Kohlenstoff-/Energiequelle enthaltenden Futterlösungen erzeugt. Dieses Verfahren ist für alle Mikroorganismen geeignet, die mittels kohlenstofflimitierten Fed-batch kultiviert werden.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C12P21/02 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

#### B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

#### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 397 097 A (LIGHT OIL UTILIZATION RES ASS) 14. November 1990 (1990-11-14) in der Anmeldung erwähnt Seite 7, Zeile 35 -Seite 8, Zeile 15 ---	1,2,5-9
X	NEUBAUER P ET AL: "Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of Escherichia coli" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL.ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 43, Nr. 3, 15. Dezember 1995 (1995-12-15), Seiten 195-204, XP004036875 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument --- -/--	1-3,5-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

\*8\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Devijver, K

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>YAZDANI SYED SHAMS ET AL: "Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy."            BIOTECHNOLOGY LETTERS,            Bd. 20, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10),            Seiten 923-927, XP000982533            ISSN: 0141-5492            Seite 925 -Seite 926</p> <p>---</p>	1,2,5-9
X	<p>TORNKVIST M ET AL: "Protein release and foaming in Escherichia coli cultures grown in minimal medium."            BIOPROCESS ENGINEERING,            Bd. 15, Nr. 5, 1996, Seiten 231-237,            XP000982521            ISSN: 0178-515X            Zusammenfassung; Abbildungen 1,4; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1-3,5-9
X	<p>KERNS G ET AL:            "OSCILLATING-FED-BATCH-TECHNIQUE IN OBTAINING CELLULASE"            ACTA BIOTECHNOLOGICA,            Bd. 8, Nr. 3, 1988, Seiten 285-289,            XP000982457            ISSN: 0138-4988            in der Anmeldung erwähnt            Zusammenfassung; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1,2,5-9
P,X	<p>YING LIN H ET AL: "Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant Escherichia coli"            BRAUWELT,NUERNBERG,DE,            Bd. 79, Nr. 1,            14. April 2000 (2000-04-14), Seiten 27-37,            XP004222563            ISSN: 0168-1656            das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-9
A	<p>IMPOOLSUP A ET AL: "STABILIZATION OF A RECOMBINANT YEAST PLASMID IN NON-SELECTIVE MEDIUM BY CYCLIC GROWTH RATE CHANGES"            BIOTECHNOLOGY LETTERS,            Bd. 11, Nr. 9, 1989, Seiten 605-608,            XP000982590            ISSN: 0141-5492</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0397097 A	14-11-1990	DE 69016693 D	23-03-1995
		DE 69016693 T	20-07-1995
		US 5279951 A	18-01-1994
		JP 3285677 A	16-12-1991
<hr/>			

(12) NACH DEM VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/20016 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:  
C12N 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:19)

C12P 21/02.

(74) Anwälte: TANNERFELDT, Agneta usw.; Pharmacia &  
Upjohn AB, S-112 87 Stockholm (SE).

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/08984

(22) Internationales Anmeldedatum:

13. September 2000 (13.09.2000)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

199 43 919.2 14. September 1999 (14.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE-WITTENBERG [DE/DE]; Universitätsplatz  
10, 06108 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUBAUER, Peter  
[DE/DE]; Haaner Weg 17, 06246 Bad Lauchstädt (DE).  
LIN, Hong, Ying [CN/DE]; Zollrain 5, Block 499, 06124  
Halle (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE YIELD OF RECOMBINANT PROTEINS IN MICROBIAL FERMENTATION  
PROCESSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR STEIGERUNG DER AUSBEUTE VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN MIKRO-  
BIELEN FERMENTATIONSPROZESSEN

(57) Abstract: The use of prior art methods for producing recombinant proteins in fed-batch fermentations often results, after the  
induction of the recombinant product synthesis, in an overgrowth of the culture due to plasmid-free cells and leads to a reduction  
of the specific product yield. The yield of recombinant proteins is thus increased by lowering or increasing, in a constantly brief  
manner, the concentration of the carbon/energy source in the culture. The oscillations are generated by altering the dosage rate of  
the feed solutions containing the carbon/energy source. This method is suited for all microorganisms which are cultivated using  
carbon-limited fed-batch.

(57) Zusammenfassung: Bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen in Fed-batch-Fermentationen kommt es bei den bis-  
her bekannten Verfahren nach der Induktion der rekombinanten Produktsynthese häufig zu einem Überwachen der Kultur durch  
plasmidfreie Zellen und zu einer Verminderung der spezifischen Produktausbeute. Die Ausbeute an rekombinanten Proteinen wird  
dadurch gesteigert, dass die Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle in der Kultur ständig kurzzeitig abgesenkt beziehungs-  
weise erhöht wird. Die Oszillationen werden durch die Veränderung der Zugaberate der die Kohlenstoff-/Energiequelle enthaltenden  
Fütterlösungen erzeugt. Dieses Verfahren ist für alle Mikroorganismen geeignet, die mittels kohlenstofflimitierten Fed-batch kultu-  
viert werden.

WO 01/20016 A2

## Verfahren zur Steigerung der Ausbeute von rekombinanten Proteinen in mikrobiellen Fermentationsprozessen

Die Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien erfolgt im industriellen Maßstab in  
5 Fermentoren. Eine Ertragssteigerung im Verhältnis zu Experimenten im Schüttelkolben-  
Labormaßstab wird über die Erhöhung der Zellmasse pro Volumen erreicht. Eine hohe  
Zelldichte kann durch die Fed-batch-Technik erzielt werden. Diese beruht auf der  
wachstumslimitierenden Zugabe einer Nährstoffquelle, wobei meistens die Kohlenstoff-  
und Energiequelle limitiert wird (z.B. Riesenberg D. and Guthke, R., 1999, Appl.  
10 Microbiol. Biotechnol. 51, 422-430). Bei *E. coli*-Prozessen ist dies beispielsweise  
Glucose oder Glycerol. Alternativ werden in Abhängigkeit vom genutzten  
Mikroorganismus und vom Prozeß aber auch andere Substrate angewandt, wie  
beispielsweise Melasse, Stärke, Pepton, Laktose, Methanol und Acetat. Die Zugabe der  
hochkonzentrierten Feedinglösung erfolgt einerseits kontinuierlich, wobei  
15 unterschiedliche Funktionen genutzt werden können, die die Zugabe der Substratlösung  
über die Zeit definieren, beispielsweise erfolgt die Zugabe mit konstanter Rate,  
exponentiell ansteigend, beziehungsweise linear an- oder absteigend. Innerhalb eines  
Prozesses werden oft verschiedene Funktionen miteinander kombiniert. Alternativ  
erfolgt die Zugabe der Nährlösung in Form von Pulsen oder Intervallen, wobei  
20 beispielsweise das Signal für den nächsten Puls der Verbrauch des Nährstoffes oder das  
Unterschreiten einer bestimmten Konzentration des Nährstoffes ist (z.B. Terasawa et al.,  
1990, EP 0 397 097 A1). Die Zugabe der Substratlösung kann aber auch über andere  
Parameter geregelt werden. Hier verwendet man als Steuerparameter beispielsweise den  
Gelöstsauerstoff (DO-stat), den pH-Wert (pH-stat), oder die *on-line* ermittelten  
25 Konzentrationen von Kohlendioxid und Sauerstoff im Abgas (z.B. Kerns et al., Acta  
Biotechnol. 8, 285-289), wobei es zu einer zyklischen Dosierung der Nährlösung  
kommt. Dabei wird die Konzentration des Substrates zwischen einer limitierenden und  
einer nichtlimitierenden Konzentration variiert. Chen et al. (1997, Biotechnol. Bioeng.  
56, 23-31) haben eine erhöhte Plasmidstabilität gemessen, wenn der Fed-batch-Kultur  
30 hochkonzentriertes Medium periodisch zugesetzt wird. Bei diesen Verfahren erstreckt  
sich ein Zyklus über mehrere Minuten bzw. Stunden, was sich jedoch negativ auf die  
Produktbildung auswirkte.

Gängige Vektoren für die Genexpression sind Plasmide, die neben dem Replikationsorigin mindestens die für das gewünschte Protein kodierende DNA-Sequenz (Produktgen) sowie einen Selektionsmarker enthalten, der die stabile Erhaltung des Plasmids über den Kulturverlauf sichern soll. Die Expression des Produktgens wird  
5 üblicherweise über regulatorische Sequenzen, insbesondere über regulierbare Promotoren, gesteuert. Die Anschaltung der Expression des Produktgens erfolgt beispielsweise durch chemische Induktoren (Substrate, Substratanaloga), die Änderung der Kultivierungstemperatur oder anderer Kulturbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, Höhe der Substratkonzentration). Insbesondere kann die Induktion  
10 auch durch einen Wechsel des limitierenden Substrates erfolgen, beispielsweise durch die Induktion des tac-Promoters mit Laktose und Umschaltung von Glucosefütterung auf Laktosefütterung (Neubauer et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 739-744).

Für den stabilen Erhalt der Plasmide in den Wirtszellen dienen als Selektionsmarker Gene, die eine Resistenz der Wirtszelle gegenüber einem Antibiotikum vermitteln. In  
15 die Kultur zur Produktion eines rekombinanten Proteins wird dann üblicherweise das entsprechende Antibiotikum zugegeben, das das Wachstum von plasmidfreien Zellen, die die Resistenzgen nicht tragen, inhibiert bzw. diese abtötet. Häufig genutzte Resistenzgen/Antibiotika-Paare sind  $\beta$ -Lactamase/Ampicillin, Chloramphenicol-acetyltransferase/Chloramphenicol, Tetracyclin-Resistenz (Tet)-Operon/Tetracyclin,  
20 Kanamycinresistenzgen/Kanamycin.

Einige dieser Resistenzsysteme haben den Nachteil, daß das Antibiotikum durch das Resistenzgen inaktiviert wird, wie z.B. Ampicillin und Chloramphenicol (z.B. Kemp G.W. und Britz M.L., 1987, Biotechnol. Techniques 1, 157-162). Diese Inaktivierung hat zur Folge, daß sich plasmidfreie Zellen in der Kultur ungehindert vermehren  
25 können. Außerdem kann es schon bei der Vorkultur zur Freisetzung der die Resistenz vermittelnden Proteine in das Wachstumsmedium kommen, die den Abbau des Antibiotikums beschleunigen. In diesen Fällen kann der Anteil plasmidfreier Zellen an der Gesamtkultur noch erhöht sein. Weiter werden in einer großen Anzahl industrieller Prozesse aus Kostengründen oder wegen des zusätzlichen Aufwandes, der bei der  
30 nachfolgenden Reinigung anfallen würde, in der auch Restspuren des Antibiotikums beziehungsweise seiner inaktivierten Form entfernt werden müssen, keine Antibiotika



eingesetzt. Auch bei solchen Prozessen entsteht meist ein bestimmter Anteil plasmidfreier Zellen.

Obwohl plasmidfreie Zellen in der Wachstumsphase häufig nur einen geringen Wachstumsvorteil haben, kommt es nach Anschaltung der Produktbildung in vielen Fällen zu einer Verminderung der Wachstumsrate der plasmidhaltigen, produzierenden Zellen und damit zu einem Überwachsen der Kultur durch die plasmidfreie Zellpopulation. Die Anreicherung plasmidfreier Zellen hat den Nachteil, daß sich der relative Anteil des Produktes an der Gesamtzellmasse verringert und in Abhängigkeit von den gewählten Aufschluß- und Reinigungsmethoden diese der Fermentation nachfolgenden Schritte erschwert werden.

Bei der Konstruktion des Vektors gibt es zwar die Möglichkeit, diese negativen Effekte einzuschränken, beispielsweise durch die Wahl des Resistenzgens, der Nutzung von alternativen, antibiotika-unabhängigen Stabilisierungssystemen (Molin und Gerdes, WO84/01172) oder durch die Nutzung modifizierter Antibiotika, die verlangsamt abgebaut werden, trotzdem werden die problematischen Resistenzen weithin eingesetzt. Außerdem ist keines der alternativen Systeme unendlich stabil und wird nur für einen gewissen Zeitraum stabil erhalten.

Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, das Hochwachsen von plasmidfreien Zellen nach Induktion der rekombinanten Produktsynthese in Fed-batch-Fermentationen, insbesondere im industriellen Bereich, ohne negative Auswirkung auf die Produktbildung zu unterdrücken.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch 1 angegebenen Merkmale gelöst, indem die Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle kurzzeitig zyklisch oszillierend abgesenkt bzw. erhöht wird. Dies wird durch die Veränderung der Zugaberate der Kohlenstoff-/Energiequelle enthaltenden Fütterlösung erreicht, z. B. durch entsprechende Programmierung der die Fütterlösung zudosierenden Pumpe. Auf diese Weise entstehen aufeinanderfolgende Phasen, in denen die Zellen entweder Substrat in limitierter Form zur Verfügung haben, bzw. Substrathunger erfahren.

Entgegen bisheriger Auffassung, daß sich Oszillationen negativ auf die Produktbildung in rekombinanten Prozessen auswirken, können überraschenderweise gezielte Oszillationen, deren Zykluslänge maximal vier eine einzelne zyklische Phase maximal

zwei Minuten beträgt, die Produktausbeute positiv beeinflussen. Besonders günstig sind Zykluszeiten einer Länge von ca. einer Minute (30 sec Feeding, 30 sec Pause).

Bei dieser Verfahrensweise, die prinzipiell in allen rekombinanten wachstumslimitierten Prozessen angewandt werden kann, in denen die Bildung des rekombinanten Produktes unter Kohlenstofflimitation induziert wird, ist von Vorteil, daß kein Zusatz weiterer Substanzen zum Fermentationsmedium erforderlich ist, sie unabhängig vom genutzten Expressionssystem ist und sich nicht negativ auf die Produktbildung auswirkt. Besonders geeignet ist das Verfahren in Fed-batch Prozessen, bei denen ein Zucker, wie z. B. Glucose, Laktose, Arabinose oder Galaktose, oder andere organische Kohlenstoffquellen, wie z.B. Methanol, Glycerol, Acetat, Melasse oder Stärke als limitierender Nährstoff der Kultur zugesetzt werden. Dabei ist das Verfahren unabhängig vom Kultivierungsmedium und kann sowohl bei der Kultivierung auf Mineralsalzmedium wie auf Komplexmedien angewandt werden.

Diese Methode ist nicht auf *Escherichia coli* als Wirtsorganismus beschränkt, sondern kann bei allen Mikroorganismen, wie z.B. *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, eingesetzt werden, die mittels kohlenstofflimitierten Fed-batch kultiviert werden. Sie ist auch unabhängig vom Induktionssystem. Jedoch ist sie bei der Nutzung des tac-Promoters besonders vorteilhaft.

Das Verfahren ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn die Expression des Genproduktes stark induziert wird und das Zellwachstum der produzierenden Zellen im Verhältnis zu einer nichtinduzierten Kultur negativ beeinflußt wird. Weiterhin hat diese Verfahrensweise in Prozessen Vorteile, in denen die Produktionsphase besonders lang ist, beispielsweise bei der periplasmatischen Expression rekombinanter Proteine oder wenn die Produktbildungsphase mit einem Temperaturshift verbunden ist.

## Ausführungsbeispiel

### *Stamm und Plasmide*

*Escherichia coli* K-12 RB791 (F<sup>-</sup>, IN(rrnD-rrnE)1,  $\lambda$ , lacI<sup>q</sup>L<sub>8</sub>; *E. coli* Stock Center, New Haven, USA) wurde als Wirt verwendet. Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pKK177glucC (Kopetzki et al., 1989a) transformiert, in dem das Gen der  $\alpha$ -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* unter Kontrolle des tac-Promoters steht. Das Plasmid

enthält das  $\beta$ -Lactamasegen als Selektionsmarker. Zusätzlich wurde ein zweites System verwendet, in das zusätzlich zu dem Plasmid pKK177glucC noch das Plasmid pUBS520 (Brinkmann et al., 1989) transformiert wurde, das das *dnaY* Gen (Minor-tRNA *argU*, AGA/AGG) enthält.

#### 5 **Kultivierungsmedium und Fermentationsbedingungen**

Für alle Kultivierungen wurde Glucose-Ammonium-Mineralsalzmedium (Teich et al., 1998, J. Biotechnol. 64, 197-210) verwendet. Die Startkonzentration für Glucose lag bei 5 g l<sup>-1</sup>. Die Feed-Lösung enthielt 200 g Glucose kg<sup>-1</sup> und alle Komponenten des Kultivierungsmediums in den entsprechenden Konzentrationen (Ausnahme (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g l<sup>-1</sup>) und 10 ml l<sup>-1</sup> der Spurenelementlösung (Holme et al., 1970), aber kein MgSO<sub>4</sub>.  
10 Dieses wurde im Verlauf der Kultivierung zu 10 ml einer 1 M MgSO<sub>4</sub> Lösung per OD<sub>500</sub>=9 zugesetzt. Ampicillin (100 mg l<sup>-1</sup>) und Kanamycin (10 mg l<sup>-1</sup>) wurden sowohl den Vorkulturen als auch dem Fermentationsmedium zugesetzt. Polypropylenglycol 2000 (50 %) wurde als Antischaummittel genutzt.

15 Als Fermentationsinokulum wurden Schüttelkulturen auf Fermentations-Mineralsalzmedium genutzt, die bei 37°C angezogen wurden. Alle Fermentationen wurden in 6 l Biostat ED Bioreactor mit einem Startvolumen von 4 L und bei einer Temperatur von 35°C durchgeführt. Die Kulturen wurden als Batch-Kultur gestartet. In dieser Phase wurden die Belüftungsrate und die Rührung in einem Kaskadenmodus  
20 reguliert, um den DOT auf mindestens 20% zu halten. Am Ende der Batch-Phase wurde die DOT-Kontrolle abgeschaltet und Belüftungsrate und Rührgeschwindigkeit auf 2vvm bzw. 800 rpm gesetzt. Der pH-Wert wurde mittels 25 %iger Ammoniaklösung auf 7.0 geregelt. Am Ende der Batch-Phase, bei einer Zelldichte von ca. 2 g DCW l<sup>-1</sup> (OD<sub>500</sub>=9) wurde die Feedingpumpe mit einer konstanten Rate von 53.2 g h<sup>-1</sup> (2.6 g Glucose l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)  
25 gestartet. Die Gesamtmenge zugesetzter Glucose war die gleiche in allen Kultivierungen, unabhängig vom Feed-Modus. Drei verschiedene Feedingstrategien wurden getestet: (A) kontinuierliches Feeding (Kontrollkultivierung), (B) unterbrochenes Feeding mit einem Zyklus von 1 Minute (30 Sekunden an, 30 Sekunden aus), (C) unterbrochenes Feeding mit einem Zyklus von 4 Minuten (2 Minuten an, 2  
30 Minuten aus). Die Expression des  $\alpha$ -Glucosidasegens wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG 3 h nach Feedingstart induziert und die Produktbildung über einen Zeitraum von ca. 20 h nach Induktion verfolgt.

### **Analytische Methoden**

Das Zellwachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 500 nm ( $OD_{500}$ ) verfolgt. Weiterhin wurde die mikroskopische Zellzahl in einer Zählkammer (0.02 mm Tiefe), und die Zelltrockenmasse (DCW) bestimmt (siehe Teich et al., 1998, J. Biotechnol. 64, 197-210). Die Anzahl koloniebildender Einheiten (cfu) wurde durch Ausstreichen verdünnter Proben auf Nähragarplatten ermittelt, die mindestens 3 Tage bebrütet wurden. Die Plasmidstabilität wurde darauf durch Überstempeln dieser Platten auf Selektivagar mit der *Replica plating*- Technik bestimmt. Das Verhältnis zwischen DCW,  $OD_{500}$  und Zellzahl wird durch folgende Beziehung charakterisiert: 1g/l DCW entspricht einer  $OD_{500}$  von  $4.5 \pm 0.1$  und einer Zellzahl von  $1.8 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ . Die Glucosekonzentration wurde mit einem kommerziellen Enzymkit ermittelt.

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Glucosidasekonzentration erfolgte nach Auftrennung von Gesamtzellproben im SDS-Gel (5 % Sammelgel, 7 % Separationsgel). Die Expression wurde durch Scannen der Produktbande und Quantifizierung im Verhältnis zu einem jeweils auf dem Gel in verschiedenen Konzentrationen aufgetragenen Produktstandard.

### **Ergebnisse**

*E. coli* RB791 pKK177glucC und *E. coli* RB791 pKK177glucC pUBS520 wurden mittels glucoselimitiertem Fed-batch in einem Rührreaktor kultiviert. Nach der ersten Batchphase wurde ein konstantes Feeding gestartet und drei Stunden nach Feedingstart wurde die Expression des  $\alpha$ -Glucosidasegens durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert. Nach Induktion kommt es zu einem Anstieg der  $\alpha$ -Glucosidasekonzentration, wobei die spezifische Konzentration des Enzyms pro Zelle ca. 5 h nach Induktion ein Maximum durchläuft, bei längerer Kultivierung aber wieder abnimmt (s. Fig. 1c). Die Abnahme der spezifischen Konzentration der  $\alpha$ -Glucosidase ist auf das Überwachsen der Kultur mit plasmidfreien Zellen zurückzuführen. Diese haben nach Induktion einen enormen Wachstumsvorteil, da sich die Produktion der  $\alpha$ -Glucosidase negativ auf das Wachstum auswirkt und auch eine Inhibition der Glucoseaufnahme in den produzierenden Zellen bewirkt. Dies führt zu einer Anreicherung von Glucose im Kulturmedium. In der Kultur vorhandene Zellen, die das Produktgen nicht enthalten, werden durch den Induktor IPTG nicht beeinflusst, vielmehr wachsen sie durch die hohe Verfügbarkeit an Glucose unlimitiert weiter.

Wenn die Glucoselösung nicht kontinuierlich, sondern pulsweise in kurzen Zyklen, die im Größenbereich einer Minute liegen, zugesetzt wird (siehe Material und Methoden), wird die  $\alpha$ -Glucosidase in ähnlicher Weise wie beim konstanten Feed nach Induktion angereichert. Allerdings kann in Abhängigkeit von der Pulslänge das Überwachsen der Kultur durch die plasmidfreie Zellpopulation verhindert werden (siehe Fig. 1d). Dieser positive Effekt auf die Unterdrückung plasmidfreier Zellen war nicht nur im in Fig. 1 dargestellten stark exprimierenden System offensichtlich, sondern auch bei der schwachen Expression der  $\alpha$ -Glucosidase im System *E. coli* RB791 pKK177glucC (Fig. 2, Tabelle 1). Außerdem hatte das pulsweise Feeding in beiden Fällen einen leicht positiven Einfluß auf die Syntheserate nach Induktion und im ersten Fall auch auf die Stabilität des Produktes, das zu mehr als 90 % in Form von Einschlußkörpern (*inclusion bodies*) vorlag. Ein wichtiger Faktor ist die Definition der Zykluszeit. In beiden gezeigten Beispielen führt die Verlängerung der Zykluszeit auf 4 min zu einer Abnahme der Produktmenge und damit des Ertrages (siehe Abb. 1, 2 und Tabelle 1). Obwohl auch in diesem fall das Überwachsen der Kultur durch plasmidfreie Zellen vermindert wurde, führt die längere Zykluszeit zu einer geringeren Produktsynthese bzw, zu einem verstärkten Abbau.

Tabelle 1: Produktivität und Überwachsen durch plasmidfreie Zellen in glucoselimitierten Fed-batch-Kulturen von E. coli RB791 pKK177glucC mit und ohne pUBS520

Art der Substratzugabe während der Fed-batch-Fermentation	$\alpha$ -Glucosidase Ertrag [mg/g Biomasse]		Plasmidfreie Zellen [% der Gesamtpopulation]	
	3 h nach Induktion	20 h nach Induktion	3 h nach Induktion	20 h nach Induktion
RB791 pKK177glucC pUBS520				
konstantes Feeding	37	30	2	72
Zyklus 1 min	38	24	1	16
Zyklus 4 min	37	6	2.5	60
RB791 pKK177glucC				
konstantes Feeding	10	9	10	10
Zyklus 1 min	14	10	0.3	2.7
Zyklus 4 min	6	4.6	15	6.7

**Die Figuren zeigen:**

**Fig. 1:** Fed-batch Fermentationen mit *E. coli* RB791 pKK177glucC pUBS520 mit Induktion durch 1 mM IPTG. Vergleich von kontinuierlicher Zugabe der Glucose-Substratlösung (a-c; offene Symbole: ohne Induktion; gefüllte Symbole: mit Induktion) mit zyklischer Zugabe (d-f) derselben Lösung ( $\blacktriangle$ : Zyklus vom 1 min;  $\nabla$ : Zyklus vom 4 min). (a,d) Zellmasse (DCW), (b,e) Glucosekonzentration, (c,f) Produktbildung (mg  $\alpha$ -Glucosidase/g Zelltrockengewicht). Die dargestellten Daten repräsentieren eine charakteristische Fermentation von 2 durchgeführten Experimenten für die kontinuierliche Zugabe und je 1 Experiment für die zyklische Zugabe. Startzeitpunkt für die Zugabe der Substratlösung (-----), Induktion mit IPTG erfolgte bei 3 h nach Feed-Start (.....).

**Fig. 2:** Fed-batch Fermentationen mit *E. coli* RB791 pKK177glucC mit Induktion durch 1 mM IPTG. Vergleich von kontinuierlicher Zugabe der Glucose-Substratlösung (a-c; offenes Symbol: ohne Induktion; gefülltes Symbol: mit Induktion) mit zyklischer Zugabe (d-f) derselben Lösung ( $\blacktriangle$ : Zyklus vom 1 min;  $\nabla$ : Zyklus vom 4 min). (a,d) Zellmasse (DCW), (b,e) Glucosekonzentration, (c,d) Produktbildung (mg  $\alpha$ -Glucosidase/g Zelltrockengewicht). Weitere Erklärungen siehe Fig. 1.

**Fig. 3:** Darstellung des Pumpenschaltschemas in einer Fermentation mit einem Zyklus von 1 min. Gezeigt ist ein kleiner Ausschnitt der Fermentation, die Reaktion des gelösten Sauerstoffs (DOT, %, —○—), sowie die Pumpenschaltung (0 = aus, 1 = an, —).

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Steigerung der Ausbeute von rekombinanten Proteinen in mikrobiellen Fermentationsprozessen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle in der Kultur in kurzen Zyklen oszillierend abgesenkt beziehungsweise erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Oszillationen durch die Veränderung der Zugaberate der die Kohlenstoff-/Energiequelle enthaltenden Fütterlösung erzeugt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge eines Zyklus maximal 4 Minuten und eine einzelne zyklische Phase maximal zwei Minuten andauert.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge eines Zyklus eine Minute beträgt und eine einzelne zyklische Phase maximal 75 % der Zykluszeit andauert.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Kultur die Kohlenstoff-Energiequelle so zugesetzt wird, daß die Zuflußrate der Substratlösung nur in bestimmten zeitlichen Abschnitten des Prozesses zyklisch variiert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuflußrate durch zyklisches An- und Abschalten des Zuflusses der Fütterlösung kontrolliert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Kohlenstoff-Energie-Substrat Glucose, Glycerol, Laktose, Arabinose, Galaktose, Methanol, Acetat, Melasse oder Stärke verwendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Induktion der Bildung des rekombinanten Produktes in Abhängigkeit vom eingesetzten Promoter der Kultur IPTG oder Indolylacrylsäure (IAA), oder wenn diese nicht bereits als Energiequelle verwendet werden Laktose, Arabinose, Galaktose oder Methanol zugesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zum Induktionszeitpunkt der Bildung des rekombinanten Produktes ein Temperaturshift erfolgt.



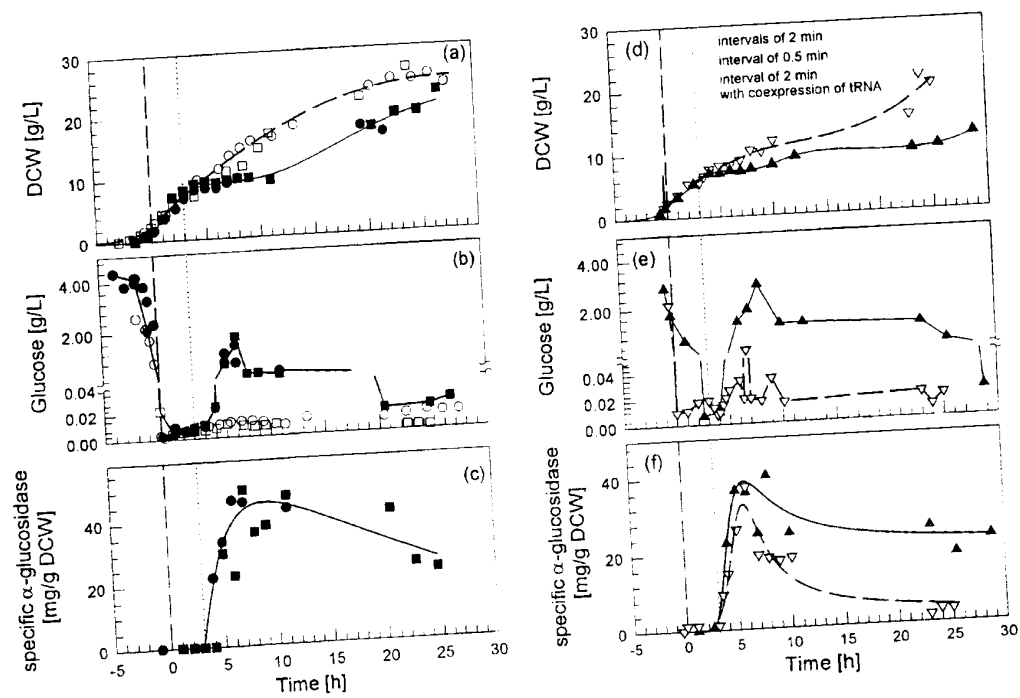


Fig. 1

2/3

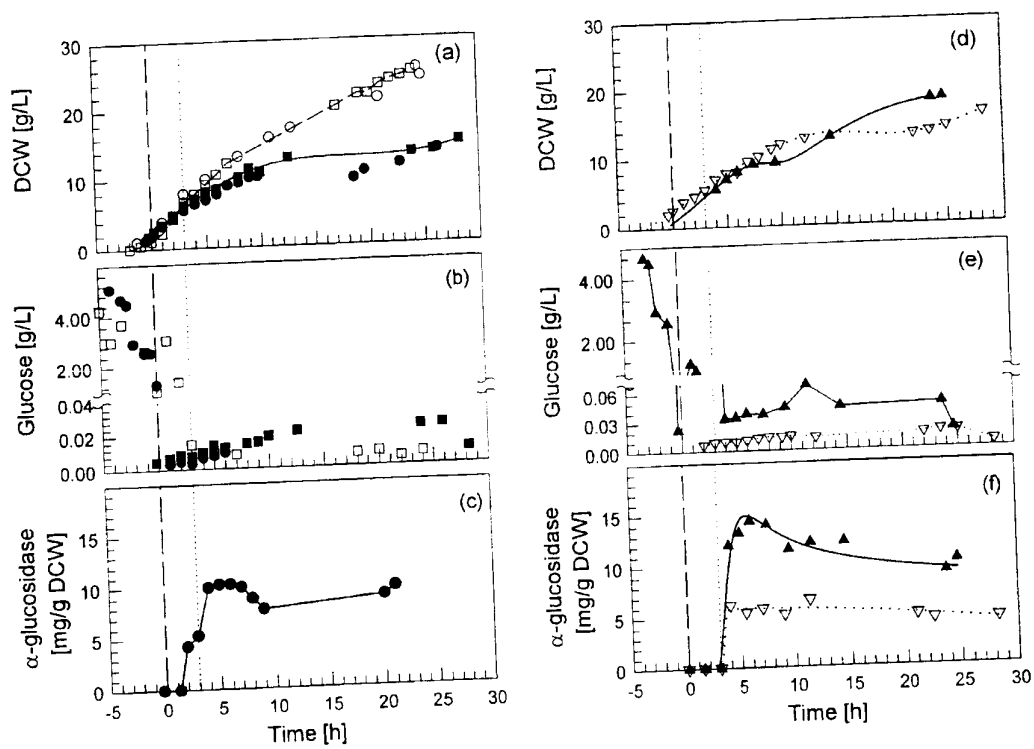


Fig. 2

3/3

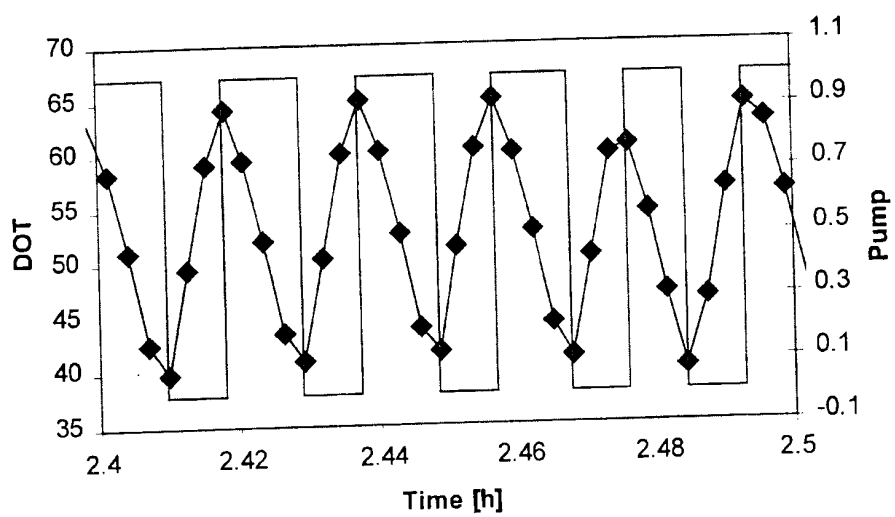


Fig. 3

(12) NACH DEM VERFAHREN ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/20016 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12P 21/02, (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08984
- (22) Internationales Anmeldedatum: 13. September 2000 (13.09.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 43 919.2 14. September 1999 (14.09.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG [DE/DE]; Universitätsplatz 10, 06108 Halle (DE).
- (72) Erfinder; und
- (73) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUBAUER, Peter [DE/DE]; Haaner Weg 17, 06246 Bad Lauchstädt (DE). LIN, Hong, Ying [CN/DE]; Zollrain 5, Block 499, 06124 Halle (DE).
- (74) Anwälte: TANNERFELDT, Agneta usw.; Pharmacia & Upjohn AB, S-112 87 Stockholm (SE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
- Mit internationalem Recherchenbericht.
  - Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. Mai 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE YIELD OF RECOMBINANT PROTEINS IN MICROBIAL FERMENTATION PROCESSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR STEIGERUNG DER AUSBEUTE VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN MIKROBIELLEN FERMENTATIONSPROZESSEN

(57) Abstract: The use of prior art methods for producing recombinant proteins in fed-batch fermentations often results, after the induction of the recombinant product synthesis, in an overgrowth of the culture due to plasmid-free cells and leads to a reduction of the specific product yield. The yield of recombinant proteins is thus increased by lowering or increasing, in a constantly brief manner, the concentration of the carbon/energy source in the culture. The oscillations are generated by altering the dosage rate of the feed solutions containing the carbon/energy source. This method is suited for all microorganisms which are cultivated using carbon-limited fed-batch.

(57) Zusammenfassung: Bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen in Fed-batch-Fermentationen kommt es bei den bisher bekannten Verfahren nach der Induktion der rekombinanten Produktsynthese häufig zu einem Überwachsen der Kultur durch plasmidfreie Zellen und zu einer Verminderung der spezifischen Produktausbeute. Die Ausbeute an rekombinanten Proteinen wird dadurch gesteigert, dass die Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle in der Kultur ständig kurzzeitig abgesenkt beziehungsweise erhöht wird. Die Oszillationen werden durch die Veränderung der Zugaberate der die Kohlenstoff-/Energiequelle enthaltenden Futterlösungen erzeugt. Dieses Verfahren ist für alle Mikroorganismen geeignet, die mittels kohlenstofflimitierten Fed-batch kultiviert werden.

WO 01/20016 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12P21/02 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 397 097 A (LIGHT OIL UTILIZATION RES ASS) 14 November 1990 (1990-11-14) cited in the application page 7, line 35 -page 8, line 15 ---	1,2,5-9
X	NEUBAUER P ET AL: "Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of Escherichia coli" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 43, no. 3, 15 December 1995 (1995-12-15), pages 195-204, XP004036875 ISSN: 0168-1656 the whole document --- -/--	1-3,5-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2001

Date of mailing of the international search report

12/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Devijver, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08984

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YAZDANI SYED SHAMS ET AL: "Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy."  BIOTECHNOLOGY LETTERS,  vol. 20, no. 10, October 1998 (1998-10),  pages 923-927, XP000982533  ISSN: 0141-5492  page 925 -page 926</p>	1,2,5-9
X	<p>TORNKVIST M ET AL: "Protein release and foaming in Escherichia coli cultures grown in minimal medium."  BIOPROCESS ENGINEERING,  vol. 15, no. 5, 1996, pages 231-237,  XP000982521  ISSN: 0178-515X  abstract; figures 1,4; table 1</p>	1-3,5-9
X	<p>KERNS G ET AL:  "OSCILLATING-FED-BATCH-TECHNIQUE IN OBTAINING CELLULASE"  ACTA BIOTECHNOLOGICA,  vol. 8, no. 3, 1988, pages 285-289,  XP000982457  ISSN: 0138-4988  cited in the application  abstract; table 1</p>	1,2,5-9
P,X	<p>YING LIN H ET AL: "Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant Escherichia coli"  BRAUWELT, NUERNBERG, DE.  vol. 79, no. 1,  14 April 2000 (2000-04-14), pages 27-37,  XP004222563  ISSN: 0168-1656  the whole document</p>	1-9
A	<p>IMPOOLSUP A ET AL: "STABILIZATION OF A RECOMBINANT YEAST PLASMID IN NON-SELECTIVE MEDIUM BY CYCLIC GROWTH RATE CHANGES"  BIOTECHNOLOGY LETTERS,  vol. 11, no. 9, 1989, pages 605-608,  XP000982590  ISSN: 0141-5492</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08984

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0397097 A	14-11-1990	DE 69016693 D	23-03-1995
		DE 69016693 T	20-07-1995
		US 5279951 A	18-01-1994
		JP 3285677 A	16-12-1991

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08984

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12P21/02 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 397 097 A (LIGHT OIL UTILIZATION RES ASS) 14. November 1990 (1990-11-14) in der Anmeldung erwähnt Seite 7, Zeile 35 -Seite 8, Zeile 15 ---	1,2,5-9
X	NEUBAUER P ET AL: "Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of Escherichia coli" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 43, Nr. 3, 15. Dezember 1995 (1995-12-15), Seiten 195-204, XP004036875 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ---	1-3,5-9
	---	---

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/03/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Devijver, K



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	YAZDANI SYED SHAMS ET AL: "Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy." BIOTECHNOLOGY LETTERS, Bd. 20, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 923-927, XP000982533 ISSN: 0141-5492 Seite 925 -Seite 926 ---	1,2,5-9
X	TORNVIST M ET AL: "Protein release and foaming in Escherichia coli cultures grown in minimal medium." BIOPROCESS ENGINEERING, Bd. 15, Nr. 5, 1996, Seiten 231-237, XP000982521 ISSN: 0178-515X Zusammenfassung; Abbildungen 1,4; Tabelle 1 ---	1-3,5-9
X	KERNS G ET AL: "OSCILLATING-FED-BATCH-TECHNIQUE IN OBTAINING CELLULASE" ACTA BIOTECHNOLOGICA, Bd. 8, Nr. 3, 1988, Seiten 285-289, XP000982457 ISSN: 0138-4988 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Tabelle 1 ---	1,2,5-9
P,X	YING LIN H ET AL: "Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant Escherichia coli" BRAUWELT,NUERNBERG,DE, Bd. 79, Nr. 1, 14. April 2000 (2000-04-14), Seiten 27-37, XP004222563 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ---	1-9
A	IMPOOLSUP A ET AL: "STABILIZATION OF A RECOMBINANT YEAST PLASMID IN NON-SELECTIVE MEDIUM BY CYCLIC GROWTH RATE CHANGES" BIOTECHNOLOGY LETTERS, Bd. 11, Nr. 9, 1989, Seiten 605-608, XP000982590 ISSN: 0141-5492 -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08984

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0397097 A	14-11-1990	DE 69016693 D	23-03-1995
		DE 69016693 T	20-07-1995
		US 5279951 A	18-01-1994
		JP 3285677 A	16-12-1991
<hr/>			